



细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	(PP2201)
浆蛋白抽提试剂 A (CER A)	4°C.	26ml
核蛋白抽提试剂 B (NER)	4°C.	5ml

本产品常温运输，4°C.保存，至少 12 个月内有效。

二、产品介绍

细胞核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒 (Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit) 提供了一种简单、方便的从培养细胞或新鲜组织中抽提细胞核蛋白与细胞浆蛋白的方法。约 90 分钟就可以完成培养细胞的细胞核蛋白与细胞浆蛋白的分离。抽提得到的蛋白为非变性，有活性，可以用于 Western, EMSA, footprinting, 报告基因检测以及酶活力测定等后续操作。本试剂盒是通过细胞浆蛋白抽提试剂 A，在低渗透压条件下，使细胞充分膨胀后破坏细胞膜，释放出细胞浆蛋白，然后通过离心得到细胞核沉淀。最后通过高盐的细胞核蛋白抽提试剂抽提得到细胞核蛋白。本试剂盒可以抽提一百个样品，如果每个样品的数量为 2×10^6 个 HeLa 细胞 (约 40mg)。可根据需要按比例放大，缩小提取规模。

三、注意事项

1. 需自备 PMSF，PMSF 一定要在抽提试剂加入到样品中前 2-3

问题	可能原因	解决方法
蛋白浓度低	抽提试剂和细胞团的体积比例不适宜	按照 20 微升细胞团 (约 40mg) 比例加 200 微升 CER A
蛋白活性低或者没有活性	样品没有保持低温操作	始终低温离心和保持样品冰上
	蛋白酶活性偏高	除了 PMSF, 可加入多种 protease inhibitor 联合抑制蛋白酶活性
胞核蛋白和胞浆蛋白有严重的相互混合	细胞浆抽提物 (胞浆蛋白) 未完全清除	细胞核抽提前, 仔细吸去所有的胞浆抽提上清
	细胞裂解不完全	加大 vortex 时间和冰浴时间
	细胞裂解过度	减少 vortex 时间和冰浴时间
	匀浆过度, 不足或者不均匀	优化匀浆时间和条件
胞浆/胞核蛋白产量同时低或者没有	可能和细胞种类有关	该种细胞系可能不适合本方法
假如裂解过程中发现变得十分粘稠或者显微镜下发现胞核裂解	裂解过度, 胞核也完全裂解, DNA 释放出来了	减少 CER A 用量比例或者不加
		减少 vortex 时间和冰浴时间



分钟内加入，以免 PMSF 在水溶液中很快失效。

2. 抽提蛋白的所有步骤都需在冰上或 4℃ 进行。
3. 本试剂盒对于组织样品，仅适合于新鲜组织，对冻存过的组织抽提效果差。可以抽提的组织样品数通常不足 100 个。
4. 使用本试剂盒抽提得到的细胞核蛋白与细胞浆蛋白都可以直接用百泰克生产的 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，不适合用 Bradford 法测定蛋白浓度。

四、使用说明

1. 准备溶液：室温融解试剂盒中的两种试剂，溶解后立即放置在冰上，混匀。取适当量的 CER A 备用，在需要加入前数分钟内加入 PMSF 至终浓度为 1mM。取适当量的 NER 备用，在需要加入前数分钟内加入 PMSF 至终浓度为 1mM。如果目标蛋白含丰富的半胱氨酸，可在 CER A,NER 中加入 DTT 至终浓度 0.5mM。
2. 对于贴壁细胞：用 PBS 洗一遍，用细胞刮子刮下细胞，或用 EDTA 溶液处理细胞使细胞不再贴壁很紧，并用移液器吹打下细胞(最好不用胰酶消化，因为可能降解蛋白)。5000g 离心 2-3 分钟收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞，以免胰酶降解需抽提的目的蛋白。
3. 对于悬浮细胞：用 PBS 洗一遍，5000g 离心 2-3 分钟收集细胞离心收集细胞，尽最大努力吸尽上清，留下细胞沉淀备用。
4. 每 20 微升细胞沉淀加入 200 微升添加了 PMSF 的 CER A。(对于 2×10^6 个 HeLa 细胞，其细胞沉淀的体积大约为 20 微升或 40 毫克。)
5. Vortex 5 秒，把细胞沉淀完全悬浮并分散开。(如果细胞沉淀没有完全悬浮并分散开，可以适当延长 vortex 时间。)
6. 离心去上清（洗细胞）

7. 加入 CER A 60 微升（沉淀的三倍体积），最高速剧烈 Vortex 5 秒，冰浴 10 分钟。
8. 最高速剧烈 Vortex 5 秒，4℃ 12,000-16,000g 离心 10 分钟。
9. 立即吸取上清至一预冷的塑料管中，即为抽提得到的细胞浆蛋白。可以立即使用，也可以冻存。(千万不要触及沉淀，可以在沉淀上方保留极小体积的上清，以免触及沉淀。)
10. 对于沉淀，完全吸尽残余的上清，加入 50 微升添加了 PMSF 的 NER。(不吸尽上清会带来细胞浆蛋白的污染。)
11. 最高速剧烈 Vortex 15-30 秒，把细胞沉淀完全悬浮并分散开。然后放回冰浴中，每隔 5 分钟再高速剧烈 Vortex 15-30 秒，共 40 分钟。
12. 4℃ 12,000-16,000g 离心 10 分钟。
13. 立即吸取上清至一预冷的塑料管中，即为抽提得到的细胞核蛋白。可以立即使用，也可以-70℃冻存。
14. 对于新鲜组织：
A: 把组织尽可能切成非常细小的碎片。在 PBS 里面匀浆制成细胞悬液，5000g 离心 2-3 分钟收集细胞，弃上清，估计细胞沉淀体积，接步骤 4。
B: 把组织称重后，把组织尽可能切成非常细小的碎片，按照每 50 毫克组织加入 500 微升的比例加入 CER A，匀浆后把匀浆液转移到塑料离心管内，接步骤 5。

四、疑难解答

问题	可能原因	解决方法
胞浆蛋白产量低	细胞没有裂解完全	增加 CER A 用量比例
	细胞团分散不完全	Vortex 剧烈完全
胞核蛋白产量低	细胞团分散不完全	Vortex 剧烈完全
	不完全细胞核分离	加入 CER A 后，加大离心时间

